Original Article

The effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation of goat spermatogonial stem cells (SSCs) in vitro

Torabi M, Rahimi-Feyli P*, Moghaddam AA

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, I.R. Iran.

Received: 2022/05/1 | Accepted: 2023/05/10

Abstract:

Background: This study aimed to the effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation of goat spermatogonial stem cells (SSCs) in vitro.
Materials and Methods: The testicles of immature goats were obtained from slaughterhouse. Isolation of spermatogonial cells was performed by two-step digestion. The isolated cells were cultured in 4 different groups: 3 groups by adding different doses of IGF-1 (10, 40 and 100 ng/ml) to the basic medium (DMEM containing 5% fetal bovine serum and 1% antibiotic) and the control group (without IGF-1). Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test at 5% level. Presence of SSCs at the end of culture was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for several important spermatogonial markers (PGP9.5, THY-1, PLZF, Oct4 and VASA) and immunohistochemical staining against PGP9.5 antigen.
Results: In this study, the number of spermatogonial cell colonies in treatment 3 was significantly higher than the control and other treatment groups on days 4, 7, and 10 of culture (P<0.05). Also, the surface area of G10 colonies on days 7 and 10 of culture was significantly different (P<0.05). The surface area of G100 on days 4, 7, and 10 after culture was significantly higher than control, G10 and G40 (P<0.05). The isolated cells expressed all surface markers related to stem cells.
Conclusion: According to this results, the addition of 100 ng/ml IGF-1 to culture medium for promoting colonization of goat Spermatogonial stem cells is recommended.

Keywords: Insulin-like growth factor-1, stem cells, Goat, Spermatogonia, RT-PCR

***Corresponding Author**
Email: peymanrahimi@razi.ac.ir
Tel: 0098 833 832 4525
Fax: 0098 833 832 0041

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2023; Vol. 27, No 2, Pages 154-163

Please cite this article as: Torabi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. The effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation of goat spermatogonial stem cells (SSCs) in vitro. ***Feyz*** 2023; 27(2): 154-63.

تأثیر فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در شرایط آزمایشگاه

میلاد ترابی [۱]، پیمان رحیمی [۲*]، علی‌اصغر مقدم [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر فاکتور رشد شبه‌انسولینی-۱ بر تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی بز در محیط آزمایشگاه بود.

مواد و روش‌ها: بیضه بز نابالغ از کشتارگاه گرفته و جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی به روش هضم دومرحله‌ای انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد سرم گوساله جنینی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استرپتومایسین) کشت داده شد و به گروه شاهد و تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب مقادیر ۰، ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ اضافه گردید. داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی در سطح ۵ درصد آنالیز شدند. جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 و همچنین آزمون RT-PCR نشانگرهای THY-1، VASA، UCHL-1(PGP9.5)، plzf و OCT-4 استفاده شد.

نتایج: تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی در تیمار ۳ در مقایسه با گروه شاهد و دیگر تیمارها در تمامی روزهای ارزیابی (۴، ۷ و ۱۰)، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. مساحت کلونی‌های تیمار ۱ در روزهای ۷ و ۱۰ کشت، اختلاف معنی‌داری را با تیمار ۲ و گروه شاهد نشان داد. همچنین مساحت کلونی‌های تیمار ۳ در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت نسبت به گروه شاهد، تیمار ۱ و تیمار ۲ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. سلول‌های جداشده تمامی نشانگرهای سطحی، مربوط به سلول‌های بنیادی را بیان کردند.

نتیجه‌گیری: برای کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در شرایط آزمایشگاه، افزودن فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ با دوز ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱، سلول بنیادی، اسپرماتوگونی بز، RT-PCR

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲، صفحات ۱۶۳-۱۵۴

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs)، تنها رده سلول‌های بنیادی در میان سلول‌های زایا هستند. این سلول‌ها ظرفیت بسیار زیادی برای انجام تقسیم خودنوسازی و تولید مداوم اسپرم در طول عمر جنس نر دارند [۱]. این سلول‌ها قابلیت این را دارند که اسپرماتوژنز را متعاقب آسیب بیضه ناشی از قرارگرفتن در معرض مواد سمی، مواد شیمیایی و اختلالات فیزیکی، از سر بگیرد. همچنین این سلول‌ها هدف مناسبی برای دستکاری و مداخلات ژنتیکی، تحقیقات درمانی در پزشکی بازساختی و آزمایش‌های بیولوژیکی محسوب می‌شوند.

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تلفن: ۰۸۳۳۸۳۲۴۵۲۵ دورنویس: ۰۸۳۳۸۳۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۱ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۲/۲۰

جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در میان دیگر سلول‌های زایای بیضه، کم می‌باشد (۰/۰۳ درصد). تمامی تلاش محققان و سمت و سوی تحقیقات، به‌سمت خلوص هر چه بیشتر کشت و تکثیر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد [۲]. کشت آزمایشگاهی این سلول‌ها ابزاری مهم برای تکثیر و ایجاد تغییر در این جمعیت سلولی نادر به شمار می‌رود و کشت طولانی‌مدت سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی، به‌عنوان روشی جهت دستیابی به اکتشافاتی از قبیل خودنوزایی و تمایز این سلول‌ها استفاده می‌شود؛ لذا جایگاهی خاصی در علم بیوتکنولوژی دارد [۳]. سلول‌های سرتولی به‌عنوان تنها سلول‌های پیکری در لوله‌های اسپرم‌ساز در واکنش مستقیم با سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی از طریق ترشح فاکتورهای رشدی همانند فاکتور نوروتروپیک مشتق‌شده از گلیال، فاکتور رشد فیبروبلاست، فاکتور شبه‌رشد انسولین (IGF-1)، فاکتور سلول بنیادی (SCF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و سیگنال‌های پاراکرین در تعادل میان تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و تکثیر آن‌ها نقش اصلی دارند. فاکتور رشد شبه‌انسولین نوع یک (IGF-1) پپتید کوچکی است که به‌صورت باندشده در سرم، به سمت پروتئین‌هایی با توانایی چسبندگی بالا

حرکت می‌کند و آن را به‌عنوان یک پروتئین خاص در نظر می‌گیرد. تاکنون مطالعات مختلفی در جهت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط‌های کشت صورت گرفته است. اهداف این مطالعات تکثیر و افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از عوامل مختلفی مانند فاکتور رشد اپیدرمی [۴] و هورمون‌هایی از قبیل FSH [۵] و تستوسترون [۶] بوده است. امروزه، نقش اغلب فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد شبه‌انسولین-IGF 1 در اکثر جانداران به‌عنوان عاملی در جهت افزایش و حفظ زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی به اثبات رسیده است [۷]. اخیراً اثبات شده که IGF-1 خاصیت بنیادینگی و تکثیر در سیستم کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را از طریق لوپ HIF-2α-OCT4/CXCR4 ارتقا می‌بخشد [۷]. همچنین نقش مهم و حیاتی IGF-1 در اسپرماتوژنز موش به اثبات رسیده است [۸]. مطالعاتی که تاکنون در زمینه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی انجام گرفته است اغلب مربوط به حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد [۱۰،۹]. اهمیت انجام این پژوهش از دو منظر قابل‌ارزیابی است: الف- با توجه به این‌که جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، پیش‌نیاز انجام تمامی آزمایش‌های بیولوژیک و نگهداری طولانی‌مدت این رده سلولی در محیط آزمایشگاه و متعاقب آن دستکاری‌های ژنتیکی و کاربردهای درمانی می‌باشد، ب- در خصوص بز، علی‌رغم اهمیت این حیوان در طراحی مدل‌های بیوتکنولوژی، تولید حیوانات تراریخته و استحصال داروهای انسانی و پروتئین‌های نوترکیب شیر از جمله فاکنور انعقادی شماره ۸ [۱۱] که در بیماران خاص مصرف می‌شود، مطالعات مربوط به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این گونه دامی دارای اهمیت است؛ بنابراین، هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تأثیر فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ بر القاء کلونی‌زایی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز (شاخص‌های تعداد و مساحت کلونی) در محیط آزمایشگاه در قالب یک دوره ۱۰ روزه کشت آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و استخراج نمونه

مطالعه حاضر تجربی می‌باشد و تعداد تکرار آزمایش ۵ مرتبه و زمان انجام آن، تابستان۱۴۰۰ می‌باشد. جامعه آماری، بیضه‌های بزغاله‌های کشتاری می‌باشد. متغیرهای موردبررسی، تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی ایجادشده در طی مدت کشت (۱۰روزه) می‌باشد. روش انجام مطالعه و استخراج سلول‌ها با استفاده از روش Aponte و همکاران [۱۲] با اندکی تغییر، به شرح ذیل انجام شد. بیضه بزغاله‌های کشتارشده نابالغ ۳-۲ ماهه، از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۳۰ کیلومتری شهر کرمانشاه تهیه و پس از کشتار به همراه اسکروتوم از لاشه جدا گردید و سریعاً در مجاورت یخ و ظرف، در مدت کمتر از ۱ ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انتقال داده شدند. به‌منظور کاهش بار میکروبی احتمالی پس از شستشوی سطح بیضه با الکل ۷۰ درصد و تنتور ید، ۵۰ گرم از بافت پارانشیم بیضه به داخل لوله فالکون (SLP, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Bi0-Idea, Iran) تجاری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, UK) انتقال داده شد و سپس سه مرتبه سانتریفیوژ (Hettach, Germany) (۱۵۰۰ دور در دقیقه) انجام گردید. در این مرحله پارانشیم بافت بیضه متعاقب شستشو به‌وسیله قیچی استریل، کاملاً قطعه‌قطعه شد تا بافت پارانشیم حالت شیرابه‌ای پیدا کند. سپس با اضافه‌کردن آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ و آنزیم تریپسین هرکدام به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, Germany)، مرحله اول هضم آنزیمی آغاز و پتری‌دیش به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. متعاقباً تعلیق با دور ۱۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ انجام گردید. با چک‌کردن تعلیق زیر میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope)، میزان پیشرفت دربازشدن کلاف لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده و مرحله دوم هضم آنزیمی آغاز شد. بدین صورت که آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و دزوکسی ریبونوکلئاز با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تعلیق سلولی اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور (۲۰۰ دور در دقیقه) قرار داده و متناوباً پیپتاژ گردید. به‌منظور توقف هضم آنزیمی، FBS با نصف غلظت محلول، به تعلیق سلولی اضافه و سپس به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰، سانتریفوژ شد. نهایتاً تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۶۰ میکرونی (Germany, sartorius) عبور داده شد.

کشت سلول‌ها

درنهایت، پس از شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در هر گوده از پلیت ۴خانه‌ایی (TPP، سوئیس) کشت داده شد. هر پلیت که حاوی ۴ گوده است؛ به‌ترتیب گوده ۱ به‌عنوان گروه شاهد و گوده‌های ۲، ۳ و ۴ به تیمارهای ۱، ۲ و ۳ اختصاص یافت. درپایان، فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ (IGF-1, Sigma-Aldrich, Germany) به شرح زیر به هر یک از گوده‌ها افزوده گردید. ضمناً محیط کشت پایه شامل DMEM، حاوی ۱

درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین – استرپتومایسین - جنتامایسین) و ۵ درصد FBS بود.

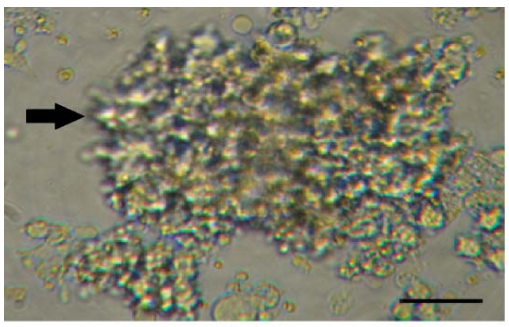
۱- گروه شاهد: محیط کشت پایه (شامل DMEM، حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک، ۵ درصد FBS) بدون افزودن فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱

۲- تیمار ۱: محیط کشت پایه حاوی فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

۳- تیمار ۲: محیط کشت پایه حاوی فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ با غلظت ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

۴- تیمار ۳: محیط کشت پایه حاوی فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

سپس پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد منتقل و به مدت ۱۰ روز کشت داده شد و هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید. محیط کشت پایه شامل DMEM، حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین – استرپتومایسین - جنتامایسین)، ۵ درصد FBS، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF (Sigma-Aldrich, Germany) و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر LIF (Sigma-Aldrich, Germany) بود. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت یک‌بار انجام شد و تعداد کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج، شمارش و قطر کلونی‌ها اندازه‌گیری شد (شکل شماره ۱). سپس با نرم‌افزار Image J (version ; National Institutes of Health , Bethesda , MD, US)، مساحت کلونی‌ها بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه گردید.



شکل شماره۱- کلونی سلول بنیادی اسپرماتوگونی در روز دهم کشت با پیکان مشخص شده است. میله: ۲۰ میکرومتر

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از ایمنوسیتوشیمی

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A در روز دهم کشت، از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 (UCHL-1) استفاده شد. بدین ترتیب که سلول‌ها پس از ترپسینه‌شدن و سانتریفوژ به لوله فالکون انتقال داده شدند و رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 با استفاده از روش حیدری و همکاران [۱۱] به شرح ذیل انجام شد: پس از جداسازی سلول‌ها، بلوک‌کردن اولین مکان غیراختصاصی به‌وسیله avidin / biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گردید. سپس، اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش (Dako, Carpinteria, USA) PGP9.5 با رقّت ۱:۱۰۰ در PBS، حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق، انکوبه شد. مقطع، پس از سه مرتبه شستشو با TBS /BSA (هر بار ۵ دقیقه) در دمای اتاق، به مدت ۴۵ دقیقه تحت تماس با آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجدداً با TBS/BSA شستشو داده شد. مقطع به‌مدت ۳۰ دقیقه در تماس با (HRP-conjugated Biosource, USA) streptavidin با رقّت ۱:۵۰۰ قرار داده و سپس با TBS/BSA شستشو داده شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی‌آمینوبنزیدین (Roche, Germany) به مقطع، به‌مدت ۱۰-۸ دقیقه رنگ نمایان گردید. سپس، اسلاید با آب مقطر کاملاً تمیز و مجدداً با هریس هماتوکسیلین، به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شد. دوباره با آب مقطر شستشو انجام گردید. سپس، اسلاید با الکل آب‌گیری، با گزیلول شفاف و با انتلان (Merck, Germany) پوشانده شد. درنهایت، سطح اسلاید به‌وسیله گلیسرول و PBS (نسبت ۱:۱) پوشانده شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست و با بزرگنمایی ۴۰۰x (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به روش RT_PCR

به‌منظور ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی، سلول‌های حاصل از کلونی اسپرماتوگونی (THY-1، VASA، UCHL-1(PGP9.5)، plzf، OCT-4 و GAPDH) از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR-RT) استفاده و بیان ژن در سطح mRNA بررسی شد. طراحی پرایمر طبق مقالات قبلی [۱۲] صورت پذیرفت (جدول شماره ۱). در روز دهم کشت به‌منظور استخراج RNA، پس از ترپسینه‌کردن و شمارش، تعداد یک میلیون سلول برای انجام آزمایش برداشته شد. RNA با استفاده از کیت تجاری (RNA-SPIN^{TM}, INTRON, Korea) استخراج گردید. عملیات استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام و سپس، با استفاده از دستگاه UV اسپکتروفتومتری، غلظت نمونه‌ها بررسی شد. RT-PCR با استفاده از کیت (VeTek^{TM}, One Step Premix Kit,

INTRON, South Korea) و طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از ترموسیکلر (BIORAD. USA) انجام پذیرفت. جهت آشکارشدن بیان ژن‌ها از ژل آگاروز با غلظت ۱/۵ درصد در بافر TAE۱ x استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ Gel Red™ (Biotium Inc, Hayward CA, USA) انجام گردید. درنهایت، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول حاوی RNA به درون چاهک منتقل شد. مدت زمان الکتروفورز ژن به‌طور متوسط، ۴۵ دقیقه بود. سپس، ژل با دستگاه ترانس لومینوت (UVP, France) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول شماره ۱- نام و مشخصات پرایمر ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موردمطالعه

نام ژن	Forward primer	Reverse primer	جفت باز(bp)	دمای ذوب (C°)
UCHL-1	TTCAGGCAGCCCACGATG	AAGGCATCCGTCCATCAAG	۱۲۶	۵۸
THY-1	CGTCTCCAATAAGGATGTC	GTCACAGGGAGATGAAGTC	۱۴۶	۵۲
VASA	TCTTGGAGATTTCCGCTG	GGCTGTGCTAACTGGCTA	۲۱۹	۵۳/۵
PLZF	CCTCAGATGACAACGACACG	CGCCTTGGTGGGACTCA	۲۲۴	۵۷/۷
GAPDH	TGCCGCCTGGAGAAACC	TGAAGTCGCAGGAGACAACC	۱۲۱	۵۹
OCT-4	GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC	ACACTCGGACCACGTCCTTC	۳۱۴	۵۸

روش تجزیه‌وتحلیل آماری

متغیرهای این مطالعه، تعداد و مساحت کلونی‌ها (میلی‌متر مربع) می‌باشد. ابتدا داده‌های جمع‌آوری‌شده از لحاظ نرمالیته ارزیابی شد. به علت عدم توزیع نرمال داده‌های مربوط به تعداد و مساحت کلونی، داده‌ها با استفاده از تست جانسون (Johonson Transformation) و با نرم‌افزار Minitab ویرایش ۱۶، نرمال شدند. سپس مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف و در روزهای گوناگون کشت و همچنین مقایسه میانگین تعداد کل و مساحت کلّ کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به کمک مدل آماری General Linear Model و با آزمون ANOVA (به‌همراه تست‌های تکمیلی Tukey and Fisher) در سطح ۵ درصد ($P<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار Minitab ویرایش ۱۶، صورت گرفت.

نتایج

ارزیابی کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ارزیابی تعداد و مساحت کلونی‌ها در پنج نوبت انجام شد که میانگین آن‌ها در روزهای چهارم، هفتم و دهم بعد از کشت اندازه‌گیری شد و نمودار آن به‌صورت میانگین±خطای استاندارد (Mean ± SE) در جداول شماره ۲ و ۳ قید گردید. همان‌گونه که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود تعداد کلونی‌ها در تیمار ۳ (دوز ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در تمامی روزهای شمارش (روزهای چهارم، هفتم و دهم) به‌ترتیب با مقادیر ۵۹/۵۷±۹۷/۷۵، ۵۱/۱۶±۱۴۲/۵ و ۴۲/۹±۱۳۳/۹۲ در مقایسه با گروه شاهد (بدون ماده افزودنی) با مقادیر ۱۸/۹۶±۵۲/۲۵، ۲۱/۹۹±۷۱/۵ و ۱۹/۶۱±۷۹ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$).

جدول شماره ۲- میانگین(Mean ± Std) تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی (حروف متفاوت درهر ستون، بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد). ($P<۰/۰۵$)

	روز۴	روز۷	روز۱۰
گروه شاهد	۵۲/۲۵±۱۸/۹۶[a]	۷۱/۵±۲۱/۹۹[a]	۷۹±۱۹/۶۱[a]
تیمار۱ (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۷۹/۵±۳۰/۰۳[a]	۱۰۶±۲۶/۶۱[a]	۹۷±۵۳/۶[a]
تیمار۲ (۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۸۳/۲۵±۴۲/۵۷[a]	۶۶/۵±۲۷/۳۶[a]	۹۲/۷۵±۴۴/۱[a]
تیمار۳ (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۹۷/۷۵±۵۹/۵۷[b]	۱۴۲/۵±۵۱/۱۶[b]	۱۳۳/۹۲±۴۲/۹[b]

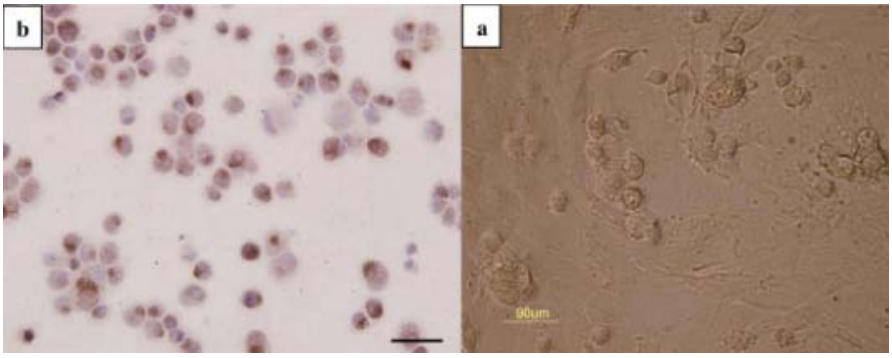
همان‌گونه که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود مساحت کلونی‌ها در روز چهارم، هفتم و دهم در گروه تیمار۳ (دوز ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب با مقادیر ۰/۷۴±۰/۸۷، ۰/۴۷±۱/۴۱ و ۰/۴۹±۱/۶۵ با گروه شاهد که به‌ترتیب مقادیر ۰/۰۸۴±۰/۳۸، ۰/۰۱۷±۰/۳۷ و ۰/۰۱۶±۰/۵ را داشت، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($P<۰/۰۵$). علاوه بر آن مساحت کلونی‌ها در گروه تیمار۱ (دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) روز هفتم (۰/۳۷±۰/۶) و دهم (۰/۰۶۴±۰/۵۷) به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد (۰/۰۱۷±۰/۳۷) و تیمار ۲ (۰/۰۳۸±۰/۹۳) بیشتر بود. این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

جدول شماره ۳- میانگین مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی (میانگین‌ها با حروف متفاوت در داخل هر ستون، دارای اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) هستند). مساحت کلونی‌ها بر حسب میلی‌متر مربع است

	روز۴	روز۷	روز۱۰
گروه شاهد	۰/۳۸±۰/۰۸۴[a]	۰/۰۱۷±۰/۳۷[a]	۰/۰۱۶±۰/۵[a]
تیمار۱ (۱۰ نانوگرم)	۰/۲۱±۰/۵۱[a]	۰/۶±۰/۳۷[b]	۰/۵۷±۰/۶۴[b]
تیمار۲ (۴۰ نانوگرم)	۰/۲۱±۰/۸۶[a]	۰/۰۳۲±۰/۷۸[a]	۰/۳۸±۰/۹۳[a]
تیمار۳ (۱۰۰ نانوگرم)	۰/۸۷±۰/۷۴[c]	۱/۴۱±۰/۴۷[c]	۱/۶۵±۰/۴۹[c]

انجام آزمایش ایمنوسیتوشیمی جهت تعیین هویت سلول‌ها

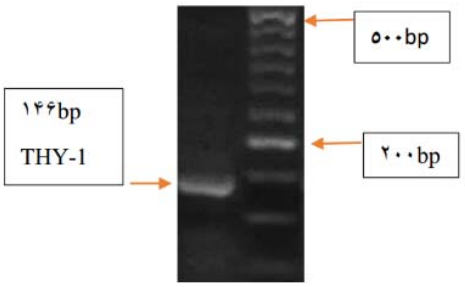
همان‌گونه که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از نشانگر مخصوص به رنگ قهوه‌ای درآمدند که نشان‌دهنده‌ی بیان مارکر PGP9.5 است که آنتی‌ژن اختصاصی سطحی سلول‌های اسپرماتوگونی می‌باشد.



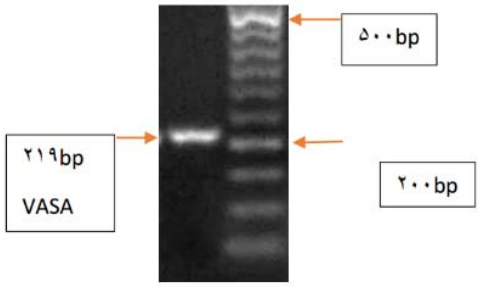
شکل شماره ۲- :a سلول‌های استخراج‌شده قبل از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی، b: رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌ها با مارکر PGP9.5 که سیتوپلاسم سلول‌های اسپرماتوگونی به رنگ قهوه‌ای درآمده است.

بررسی بیان ژن با استفاده از RT-PCR

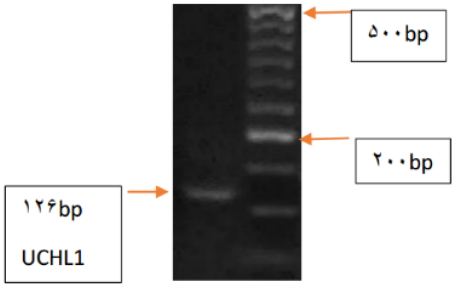
بیان ژن‌های شاخص سلول‌های اسپرماتوگونی در سطح mRNA، با استفاده از تکنیک RT-PCR انجام شد که نتایج حاکی از بیان ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی پس از ۱۰ روز کشت بود که در تصاویر شماره ۳ تا ۸ نشان داده شده است. در این مطالعه از ژن GAPDH به‌عنوان ژن خانه‌دار جهت بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد.



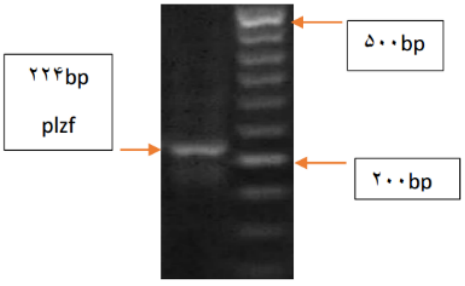
شکل شماره ۳- بیان ژن THY-1 سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)



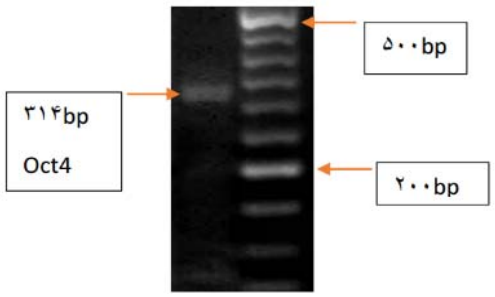
شکل شماره ۴- بیان ژن VASA سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)



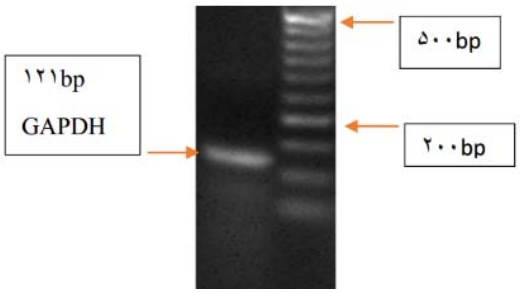
شکل شماره ۵- بیان ژن UCHL-1(PGP9.5) سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)



شکل شماره ۶- بیان ژن plzf سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)



شکل شماره ۷- بیان ژن OCT-4 سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)



شکل شماره ۸- بیان ژن GAPDH سلول اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)

بحث

هدف اصلی این تحقیق، جداسازی و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی بز در محیط آزمایشگاه و بررسی اثرات فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ در افزایش مقدار رشد و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی بز در شرایط آزمایشگاهی و تعیین بهترین دوز تأثیرگذار فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ بر تعداد و مساحت کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاه بود. تاکنون، نشانگر بیوشیمیایی یا ریخت‌شناسی کاملاً اختصاصی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کشف نشده است؛ با این حال استفاده از ترکیب تعدادی از این مارکرها قطعاً اطلاعات مهمی درخصوص چندوچون، وضعیت و ماهیت سلول‌های جداشده ارائه می‌دهد. از این‌رو، در این مطالعه به‌منظور تأیید وجود سلول اسپرماتوگونی در طول مدت کشت، از نشانگرهای تقریباً اختصاصی سلول‌های زایا (THY-1، VASA، UCHL-1(PGP9.5)، plzf و OCT-4) با استفاده از تکنیک RT-PCR بهره گرفته شد و بیان نشانگرهای فوق تا حد زیادی اثبات‌کننده وجود این دسته از سلول‌ها (اسپرماتوگونی) در میان سلول‌های جداشده و کشت‌شده در طی مدت آزمایش می‌باشد. OCT4، یک نشانگر عمومی سلول‌های بنیادی است و همچنین در سلول‌های اسپرماتوگونی موش و سایر حیوانات نیز بیان می‌شود [۱۴،۱۳] و Plzf، به‌عنوان یک نشانگر اختصاصی اسپرماتوگونی در بسیاری از گونه‌ها پذیرفته شده است [۱۵]. ژن THY-1، برای

نخستین بار به‌عنوان نشانگر سطحی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایزنیافته در جوندگان، انسان و گاو، مورد استفاده قرار گرفت [۱۷،۱۶]. عباسی و همکاران بیان آن را در بز نیز به اثبات رساندند [۱۲]. ژن VASA، یکی از فاکتورهای اساسی برای بقا و حفظ عملکرد سلول‌های زایاست [۱۸] که Bahadorani و همکاران بیان این ژن در سلول‌های اسپرماتوگونی بز را نشان دادند [۱۹]. در مطالعه حاضر نشانگر PGP9.5 با آزمایش ایمنوسیتوشیمی ردیابی شد و سلول‌های جداشده، این نشانگر را بیان کردند و سیتوپلاسم به رنگ قهوه‌ای درآمد. در مطالعه‌ای که حیدری و همکاران روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز انجام دادند، برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی‌شده، از نشانگرهای اختصاصی PGP9.5 استفاده کردند [۱۱]. همچنین در مطالعات زندی و همکاران [۵] و عباسی و همکاران [۱۲] بیان نشانگر سطحی PGP9.5 جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های اسپرماتوگونی بز استفاده شده و به اثبات رسیده است که نتایج مطالعه حاضر نیز بسیار شبیه این مطالعات می‌باشد. این ژن در سلول‌های پیش‌ساز زایای نر بیان می‌شود اما در سلول‌های سوماتیک بیانی ندارد؛ از این‌رو به‌عنوان نشانگر مطلوب سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه محسوب می‌شود [۲۲،۲۱]. فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ شامل یک زنجیره پپتیدی متشکل از ۷۰ آمینواسید با ۳ پل دیسولفیدی است و همولوگ پروانسولین می‌باشد [۲۳]. فاکتور رشد شبه‌انسولینی-۱ مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول را مهار می‌کند و دارای اثرات میتوژنیک روی سلول‌هاست [۹]. در این مطالعه، افزودن IGF-1 با دوز ۱۰۰ نانوگرم، بیشترین اثر را بر تزاید سلول‌های اسپرماتوگونی داشت. محیط کشت غنی با ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر IGF-1، سبب تکثیر و افزایش نرخ زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی گاو، متعاقب انجماد شد [۹]. مشاهده گردیدکه این خاصیت IGF-1 (تقویت تکثیر و کلونی‌زایی) وابسته به دوز می‌باشد. IGF-1، از طریق مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt و تنظیم فاکتور رونویسی OCT4 در جهت حفظ خاصیت بنیادینگی سلول‌های اسپرماتوگونی، نقش ایفا می‌کند. همچنین IGF-1 تقسیم سلولی را از فاز G2/M، تنظیم می‌نماید [۲۴] و ممکن است اثرات میتوژنیک آن نیز در مطالعه حاضر بواسطه این مکانیسم باشد. Solgi و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کردند که دوز بهینه فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد [۲۶]. در مطالعه دیگر دیده شد که استفاده از IGF-1 با دوز ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، سبب بهبود و ارتقاء خاصیت بنیادینگی سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند می‌شود [۲۷]. همچنین Xin Zhao و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی اثرات برخی فاکتورهای رشد بر سلول‌های اسپرماتوگونی خوک پرداختند. نتایج حاصل از آن مطالعه، دوز بهینه IGF-1 را ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر ذکر کرده‌اند؛ البته در آن مطالعه اثر ترکیبی چند فاکتور رشد به‌صورت همزمان بررسی شد که احتمال اثرات متقابل و بعضاً هم‌افزایی را بالا می‌برد [۲۸]. براساس تحقیقی که Palma و همکاران انجام دادند به محیط حاوی سرم گاو فحل، میزان ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر IGF-1 سلول‌های گرانولوزا افزودند و دریافتند که در هیچکدام از مرحله‌های تقسیم سلولی، با افزودن مقدار ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تغییری مشاهده نشد اما از روز ۱ به بعد، افزودن ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر IGF-1 باعث افزایش معنی‌داری در تقسیم سلولی و رشد بلاوستوسیست‌ها می‌شود [۲۹]. مکانیسم محتمل برای IGF-1 توسط LeRoith و همکاران توضیح داده شده است به این ترتیب که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ به گیرنده‌های تیروزین کیناز خود متصل می‌شوند و این اتصال باعث فعال‌شدن مسیرهای phosphoinositide 3-OH kinase/Akt و mitogen-activated پروتئین کیناز می‌شود کهآن هم به نوبه‌ی خود باعث افزایش سلول‌ها و افزایش زنده‌مانی آن‌ها می‌گردد [۳۰]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Lin و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام پذیرفت دیده شد که زنده‌مانی سلول‌های کاردیومیوسیت که درمعرض بیان بیش از اندازه IGF-1 بوده‌اند، بیشتر گشته و آپوپتوزیس آن‌ها تا حد زیادی سرکوب شد. این محققان مکانیسم مؤثر در این حالت را ناشی از مسیر AKT / (SFRP2) عنوان کردند [۳۱]. احتمالاً فاکتور شبه‌رشد انسولینی-۱ در دوز خاص از طریق سرکوب نسبی گیرنده‌های ژن‌های مرتبط با آپوپتوز از جمله BAX و Bcl2 به رشد و کیفیت کلونی‌های اسپرماتوگونی کمک می‌نماید [۳۲].

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، افزودن مقدار ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند اثر مثبتی بر رشد کلونی‌ها در دوره کوتاه‌مدت کشت (۱۰روزه) داشته باشد. با توجه به مطالعات مشابه دیگر، احتمالاً این فاکتور رشد از طریق مهار مرگ سلولی و کمک به افزایش زنده‌مانی، در این امر مؤثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان هیچ تضاد منافعی را گزارش نکردند. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی می‌باشد و تمامی هزینه‌های آن از محل بودجه مصوب پایان‌نامه‌های دانشجویی

توسط حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه رازی تأمین شده است.

References:

[1] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Morimoto H, Shiromoto Y, Ogura A, et al. Regeneration of spermatogenesis by mouse germ cell transplantation into allogeneic and xenogeneic testis primordia or organoids. ***Stem Cell Rep*** 2022; 17(4): 924-35.

[2] Kadivarian H, Alimohammadi S, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. Evaluation of the effect of follicle stimulating hormone (FSH) on survival and colonization of caprine spermatogonial stem cells during in vitro culture (Persian). ***Qom UMSJ*** 2020; 13(12): 1-12. [in Persian]

[3] Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. ***Bio Reprod*** 2003; 68(6): 2207-14.

[4] Lee R, Park HJ, Lee WY, Han MG, Park JH, Moon J, et al. Effect of Epidermal Growth Factor on the Colony-formation Ability of Porcine Spermatogonial Germ Cells. ***Biotechnol Bioproc E*** 2021; 26: 677–87.

[5] Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro (Persian). ***Feyz*** 2016; 20 (3): 205-13. [in Persian]

[6] Kuo YC, Au HK, Hsu JL, Wang HF, Lee CJ, Peng SW, et al. IGF1R promotes symmetric self-renewal and migration of alkaline phosphatase+ germ stem cells through HIF-2α-OCT4/CXCR4 loop under hypoxia. ***Stem Cell Rep*** 2018; 10(2): 524–37.

[7] Yao J, Zuo H, Gao J, Wang M, Wang D, Li X. The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2017; 491(3): 840-7.

[8] Qasemi-Panahi B, Tajik P, Movahedin M, Moghaddam G, Geranmayeh MH. Study of insulin-like growth factor 1 effects on bovine type a spermatogonia proliferation and viability. ***Turk J Vet Anim Sci*** 2014; 38(6): 693-8.

[9] Xi HM, Ren YJ, Ren F, Li Y, Feng TY, Wang Z, et al. Recent advances in isolation, identification, and culture of mammalian spermatogonial stem cells. ***Asian J Androl*** 2022; 24(1): 5-14.

[10] Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9. 5 markers. ***J Assist Reprod Genet*** 2012; 29(10): 1029-38.

[11] Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, Van de Kant H J, De Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. ***Reprod*** 2008; 136(5): 543-57.

[12] Abbasi H, Tahmoorespur M, Hosseini, SM, Nasiri Z, Bahadorani, M, Hajian M, et al THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. ***Theriogenology*** 2013; 80(8): 923-32.

[13] Hermann B, Sukhwani M, Hansel M, Orwig K. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences to those in rodents? ***Reprod*** 2010; 139(3): 479–93.

[14] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 2004; 101(47): 16489–94.

[15] Zargarzadeh M, Tajik P, Movahedin M, Akbari G, Qasemi-Panahi B. Immediate cryopreservation of isolated Ghezel ram spermatogonial stem cells and subsequent co-culture with Sertoli cells preserve their survival and functional capacity. ***Eurasia J Biosci*** 2019; 13(2): 1129-35.

[16] Reding SC, Stepnoski AL, Cloninger EW, Oatley JM. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. ***Reprod*** 2010; 139(5): 893-903.

[17] Givelet M, Firlej V , Lassalle B, Sophie Gille A, Lapoujade C , Holtzman I, et al. Transcriptional profiling of β-2M $^{-}$ SPα-6 $^{+}$ THY1 $^{+}$ spermatogonial stem cells in human spermatogenesis. ***Stem Cell Report*** 2022; 17(4): 936-52.

[18] Azizi H, Ranjbar M, Rahaiee S, Govahi M, Skutella T. Investigation of VASA Gene and Protein Expression in Neonate and Adult Testicular Germ Cells in Mice in Vivo and In Vitro. ***Cell J*** 2020; 22(2): 171-7.

[19] Bahadorani M, Hosseini MS, Abbasi H, Abedi P, Nasr-Esfahani M H. Effect of different serum concentrations on short term in vitro culture of goat testicular cells. ***Russ J Dev Biol*** 2016; 47(5): 269-77.

[20] Ahmadi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Assessment of the cryoprotective effects of fetal bovine serum (FBS) and trehalose on the viability rate of caprine spermatogonial stem cells (Persian). ***Feyz*** 2021; 25(1): 714-23. [in Persian]

[21] Choi Y, Jung Y, Kim S, Kim J, Jung H, Yoon M. Stage-Dependent Expression of Protein Gene Product 9.5 in Donkey Testes. ***Animals.*** 2020; 10(11): 2169.

[22] Song H, Park HJ, Lee WY, Lee KH. Models and Molecular Markers of Spermatogonial Stem Cells in Vertebrates: To Find Models in Nonmammals. ***Stem Cells Int*** 2022; 2022.

[23] Al-Samerria S, Radovick S. The Role of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in the Control of Neuroendocrine Regulation of Growth. ***Cells.*** 2021; 10(10):2664.

[24] Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. ***FASEB J*** 2009; 23(7):2076–87

[25] Solgi M, Rahimi-Feyli P, Nikousefat Z, Moghaddam, AA. Effect of insulin-like growth factor (IGF-1) on proliferation of ovine spermatogonia stem cells. ***Onl J Vet Res*** 2016; 20(5): 327-34.
[26] Binsila BK, Selvaraju S, Ghosh SK, Ramya L, Arangasamy A, Ranjithkumaran R, Bhatta R. EGF, GDNF, and IGF-1 influence the proliferation and stemness of ovine spermatogonial stem cells in vitro. ***J Assist Reprod Genet*** 2020; 37: 2615–30.
[27] Zhao X, Wan W, Li B, Zhang X, Zhang M, Wu Z, Yang H. Isolation and in vitro expansion of porcine spermatogonial stem cells. ***Reprod Domest Anim*** 2022; 57(2): 210-20.
[28] Palma GA, Müller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. ***J Reprod Fertil*** 1997; 110(2): 347-53.
[29] LeRoith D, Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. ***Cancer Lett*** 2003; 195(2): 127-37.
[30] Lin M, Liu X, Zheng H, Huang X, Wu Y, Huang A, et al. IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway**.** ***Stem Cell Res Ther*** 2020; 11: 22.
[31] Alinejad G, Khorrami N, Tajik P. Effect of IGF-I on the colonizing ability, viability and apoptosis related genes expression in sheep's spermatogonial stem cells. ***Vet Res Biol Prod*** 2022.